

D3

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭61-500565

⑬ 公表: 昭和61年(1986)3月27日

⑭ Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	予備審査請求	未請求	部門(区分)	6(1)
G 01 N 33/543 31/22 33/52	1 2 1	J-7906-2G 8506-2G 8305-2G 8214-4C 8213-4B						
// A 61 K 39/00 C 12 Q 1/00								

(全 13 頁)

⑮ 発明の名称 化学分析装置とその使用

⑯ 特 願 昭59-504501

⑰ 翻訳文提出日 昭60(1985)8月1日

⑱ 出 願 昭59(1984)11月30日

⑲ 国際出願 PCT/SE84/00409

⑳ 国際公開番号 WO85/02466

㉑ 国際公開日 昭60(1985)6月6日

優先権主張 ㉒ 1983年12月2日㉓ スウェーデン(SE)㉔ 830666-2  
㉕ 1984年7月27日㉖ スウェーデン(SE)㉗ 840383-5

⑳ 発 明 者 スワンルユング、カール・グス スウェーデン国、エスー14200・トラングサンド、アルトヴェーゲン・61  
㉑ 出 願 人 ヴェルトリク・バイオテクニ スウェーデン国、エスー142 00・トラングサンド、アルトヴェーゲン・61  
㉒ 代 理 人 弁理士 川口 義雄  
㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), JP, NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

請 求 の 範 囲

1. 被試験試料を該試料と反応して検出可能な物質を形成する少なくとも1つの試薬と接触させた後にその物質を検出して定性的または定量的測定を行う、特に例えば免疫化学分析などの医学的分野における化学的分析用装置であつて、該装置が少なくとも2つのセグメント(6、8または30、31)の連続シートから成つており、そのうち第1セグメント(6または30)は前記試薬の少なくとも1つが最初から存在してその上で前記試料と試薬の接触が行われるサイト(13または35)を含んでおり、第2セグメントは望ましくは最初から所望の検出用試薬が存在してその上で検出可能な物質の有無が示されるサイト(17または39)を含んでおり、該第1および第2セグメント(それぞれ6と8、またはそれぞれ30と31)は、試薬を有するサイト(13または35)が検出用のサイト(17または39)と重なり合うように折り曲げ可能であり、また該装置は試料と試薬の接触中に反応しなかつた試薬を分離するための少なくとも1つの手段(7または48)を含み、前記手段は検出可能物質の有無が示される前に作動されるように配置されており、存在するセグメントは

所望のセグメントが相互に重なり合つて所定の分析段階を送行できるように折り曲げ可能であることを特徴とする装置。  
2. 試薬分離用手段が分離素子または媒体09を含む第3セグメント(7)であり、前記第3セグメントは前記第1セグメント(6)と前記第2セグメント(8)との間に折り込まれるように配置されていることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の装置。  
3. 試薬分離用手段が第1セグメント(30)のサイト(35)に隣接して配置された1つまたはそれ以上の分離または吸収用媒質(48)であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。  
4. 前記分離または吸収用媒質が前記第1セグメントの1つまたはそれ以上のウエルまたは容器(51)の中に配置されており、反応しなかつた試薬を洗浄除去するために領域(35)に洗浄溶液を適用する際、前記洗浄溶液が自動的にウエル内に分離または吸収されるように構成されていることを特徴とする、請求の範囲第3項に記載の装置。  
5. 該装置が、使用される検出反応の抑制剤を含むサイト09を有する追加セグメント(9)を含んで成り、該セグメント(9)は折り曲げられて第2セグメント(8)と接触し、検出反応を抑制すべく配置されていることを特徴とする、前記何れか1つの請

特表昭61-500565(2)

- 求の範囲に記載の装置。
6. 該装置が試薬(41)を含む1つまたはそれ以上の追加セグメント(32)を含んで成り、該セグメントは何れか所望の順序で折り曲げられて試料または先の何れかの段階で形成された反応生成物と反応すべく配置されていることを特徴とする、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置。
  7. 該装置が試料の適用または希釈用のセグメントを含んで成り、該セグメントは別のセグメント上にある何れか所望の試薬と試料を接触させるべく折り曲げられるように配置されていることを特徴とする、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置。
  8. 検出用試薬が発色試薬であり、セグメントの1つが基準色を付けた1つまたはそれ以上の窓(20)を含んでいて、その基準色と発色された色とを直接比較して分析評価が行えるように構成されていることを特徴とする、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置。
  9. 該装置が使用準備の整ったパッケージ形態となつている時セグメントは本質的に相互に重なり合うように折り曲げ可能であることを特徴とする、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置。
  10. 折り曲げ可能なセグメントを有する連続シートがボール紙、プラスチック又はその他の容易に折り曲げ可能な材料の単片から構成されていることを特徴とする、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置。
  11. 固体相から流体相を分離することと流体相中の物質を検出することを含む分析に使用するための前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置であつて、第1セグメント(6)上のサイトが容器(4)を含み、該容器の中に試料を加えて該容器内に存する固体相試薬(4)と反応せしめるかあるいはまた反応させて固体相を形成するべく構成されており、容器開口部は望ましくは試料が加えられるまでの間試薬を保持する例えば箔などの保護層(4)により被覆されており、また第2セグメント(8)上のサイト(8)は流体相の所望の物質を検出する試薬を含んでおり、さらに流体相は通過させるが固体相は通過させない例えば濾紙などの分離素子または媒体(8)を含む第3セグメントは第1セグメント(8)の容器(4)の間に折り込まれるように配置されており、装置の反転時流体相が検出用試薬と接触(これ等より)構成されていることを特徴とする前記装置。
  12. 抗原抗体反応に基づく酵素免疫測定法に使用される前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置であつて、第1セグメント上のサイトが試料中の抗原または抗体の有無に関連して酵素が吸収されることになる固体層を含んでおり、第2セグメントは、前記第1セグメント上のサイトの固体相により吸収されなかつた酵素又は洗浄後第1セグメントの前記サイトの固体相上に残存している酵素と反応する酵素基質を含んでいることを特徴とする装置。
  13. 抗原抗体反応に基づく酵素免疫測定法に使用するための請求の範囲第1、3〜4、6〜10および12項の何れかに記載の装置であつて、試料添加用の透明プラスチック製のサイトと望ましくは対照試料用のサイトも有しており、該プラスチックがそれに固定された抗体または抗原の形態で試薬を備えている第1セグメントと、発色性酵素基質の形態で検出用試薬を備えたサイトを有する第2セグメントと、可溶性で任意に凍結乾燥した酵素標識抗体または抗原を有する吸収パッドを備えたサイトを含んでおり、第2セグメントを折つて第1セグメントと重ね合わせる前に前記第1セグメントと重なり合うべく折り曲げられるように配置されている第3セグメントと、第1セグメントの少なくとも1つのウェルの中に吸収材料の形態で配置されており、他のセグメントを折つて第1セグメントに重ね合う前に第1セグメント上の透明プラスチックに洗浄液を加えて反応しなかつた試薬を洗い流す際前記洗浄溶液が自動的に前記吸収材料に吸収されるように構成されている分離手段とを特徴とする装置。
  14. 化学的分析、特に例えば酵素免疫測定法、発光免疫測定法、ルミネセンス免疫測定法などの免疫化学分析や、核酸間のハイブリダイゼーション反応に基づく分析などの医学および農薬分野における化学的分析における、前記何れか1つの請求の範囲に記載の装置の使用。

## 発明の名称

明 細 書

### 化学分析装置とその使用

#### 技術分野

本発明は、化学分析の分野、より詳細には化学分析を行うための装置およびその使用に係る。本発明の適用できる分析とは、被試験材料が試料と反応する試薬と接触して検出可能な物質を形成し、その物質の定性的あるいは定量的測定を行うようなものである。本発明は特に医学分野、例えば免疫化学分析の分野に係るが、それに限定されるものではなく、発明の基本的思想は上に挙げた様な多様な分析に応用し得るものである。

#### 発明の背景

酵素免疫測定法（EIA）、発光免疫測定法（FIA）などの免疫化学分析においては、殆どの場合、標識抗原抗体複合体から遊離標識抗原または遊離抗原抗体を分離しなければならない。このことは通常、例えば粒子や表面などの形態で存在し得る固体相により達成され、遊離標識成分または複合体の何れかが分子の大きさ、吸光度または化学的結合（免疫化学的結合を含む）のタイプの相違に依りて固体相によつて維持されることになる。今日行われているこのような分析の機能的なものでは、一連の反応を行うためにいくつかの液体処理段階を要する。そのため、

術の例として、スウェーデン特許出願第 8 2 0 5 7 5 1 - 4 号に記載された技術を挙げることができる。但しこれをもつて、この分野での文献が尽きるものではない。

本発明をより明らかにするために、それが関連する技術的分野の他にも、文献の中に開示されている数多くの簡単な拡散装置、すなわち試料を受動的にあるいは毛管力によつて1つまたはそれ以上の化学的活性層を通して拡散させる装置とは、本発明装置は何ら関係がないことも付言せねばならない。この種の装置を開示している例として米国特許 3,511,608 号、英国特許 2,031,583 号、欧州特許 6,439,2 号、米国特許 4,066,403 号、欧州特許 5,118,3 号がある。これらの特許に関する限り、米国特許 3,511,608 号に開示されている成なり合うセグメント、あるいは英国特許 2,031,583 号および欧州特許 6,439,2 号に開示されている折畳み式シートなどは拡散装置の製造方法に関するものであり、分析を遂行するという機能的には持つておらず、分析中前記セグメントやシートは相互に恒久的に連結されて単独片になつているという点を指摘しなければならない。英国特許 2,031,583 号、欧州特許 6,439,2 号などにはユーザによつて折畳み可能なフラップが存在しているが、これらのフラップは保護用のみまたは

## 特表昭 61-500565 (3)

現在利用されている技術を用いる限り、ほとんどの免疫化学分析は訓練された職員のいる研究所によるものに限定されている。

本発明による装置を用いると、上述のような分析の処理段階および操作段階が相当容易になり単純化できるため、例えば診療所や病院の医師、看護婦など特に訓練を受けていない者でも前記分析を行えるということが証明された。本発明装置は多くの場合患者本人ですら取扱い可能である程に単純化されている。これに関連して重要なことは、本発明装置はその非常に単純な構造ゆえに、非常に安価に製造できる、つまり市販して広範囲の使用に供することができ、少なくとも定性的および半定量的テストについては医師の診察を受ける前に患者自身でも病気の状態をある程度把握できるということである。

しかし、先にも述べたように、本発明装置は決して免疫化学的分析関連の使用に限定されるものではない。分かり易く説明するため、このことに関連して後に詳細に述べることにする。この点でさらに付言できることは、上述の分析およびその中で使用される試薬は周知であり、多くの文献に開示されているということである。従つて、当該技術分野において適当な文献が存在することから、ここではそれらについて繰返し詳述する必要はないと考える。免疫化学的分析の分野で用いられている技

カバーとして用いられているだけであり、化学的あるいは分析上の工程に役立つものではない。

本発明装置が上記の装置と本質的に異なるのは、拡散原理に依っていないという事実である。その代り、実験室における様に段階毎に分析を行う。発明概念の新規な点は、ビベット操作を繰返すことによつて液体試料と試薬を試験管とピーカーとの間で移動させる必要がないということである。その代り、装置の表面上に試料、試薬、また洗浄液能さをも備え付けられている。該表面上での試料または試薬の移動は、簡単な折り曲げ動作で達成できる。このことは、米国特許第 4,066,403 号と欧州特許第 5,118,3 号などに開示された型式の多層式拡散素子以上に相当の利点を提供するものである。本発明装置ではユーザはいろいろな反応段階のタイミングを完全に調節できるのに対し、多層式の拡散装置では製造業者による層の材料の選択によつてのみしかそのタイミングが変更できない上、それも限られた限度でしかない。その上、本発明による装置はその基本的構造や設計に大きな変更を加えることなく、ほとんどの物質の分析に利用することができる。免疫化学的分析においては、分子量 500 を超えない薬品からそれよりも 10 倍も大きい金細胞およびバクテリアまで、大きさが極端に異なる物質を扱

## 特表昭61-500565(4)

り。大きさの異なる物質は拡散率も異なるため、拡散装置では分析の種類毎に層の型式も調整する必要があるという点でさらに不利となる。最後に付言せねばならないのは、本発明による装置の製造方法および貯蔵特性は確立された技術にのっとりたものであるが、多層式の免疫化学的拡散装置ではこれらの要素を達成することが難しいことが証明されている。

### 発明の開示

本発明による装置を手短かに説明すると、分析を行う上で必要と全ての化学的作用部品が装置内に組込まれている、すなわち装置以外で分析を行う段階を全く必要としない、上述のような分析を行うための完全な試験キットであると言える。これらの化学的に作用する部品は、単純な折り曲げシステムにより、試料および相互に接触するように配置または装荷されている。さらに、前記折り曲げシステムは完全に自己指示方式とすることができ、すなわち分析を行う上での指示も折り曲げシステムの中に含ませることもできるし、また多数の番号付きあるいは色分けしたタブを折り曲げシステムの中に含ませて、このタブに操作順序の指示を段階的に与えさせるようにすることも可能である。これに加えて本発明装置は一体的部品として結果表示装置も含むことができるが、これは例えば色または発光の形態

される前にその機能を行えるように配置されていることも、本発明の特徴である。

要言すると、本発明の基本的思想は、試薬を組み込んだ多数のセグメントが相互に連結されて1つの連続した構造になつており、またそれらが折り曲げられることによつて所望の試薬を相互に接触させることができるようになっていくということである。最も単純で、従つて最も安価な構造と言うと、前記シートを例えば折り線を付けた紙シートやプラスチックシートなど形態にある単一片としたようなものであつて、その折り線に沿つて一定のセグメントを相互に折り畳まれるようにしたものとなる。「連続的のシート」という言葉は、別々のセグメントを相互に連結したすべての構造を意図したものである。本発明はもちろんセグメントを別個に製造する方法によつても応用でき、この場合セグメントはヒンジ等の連結機構を用いて相互に連結される。このようなより洗練された装置は原則として、例えば容易に交換可能な化学的試薬を含むサイトなどを用いて何度か使用するための装置に応用され得るが、ほとんどの場合、装置は使い捨てとされる。この場合経済的理由から簡単な折り畳み式材料が好ましい。

ここに挙げた型式の分析には、検出を開始する前に、1つま

で正か負または任意に定量的な応答を与えるものとすることができ。言い換えると、必要な試薬と反応段階の全てを非常に単純かつ小型で安価な構造の中に組み入れることができ、それによつてこれまで実現されていなかった機会、特に医学の分野における機会を提供するものである。

より詳細に言うと、本発明による装置は、2つまたはそれ以上のセグメントを有する連続シートを含んで成り、第1のセグメントには試料と試薬との接触が行われるサイトが含まれ、第2のセグメントには所望の検出可能物質の有無が示されるサイトが含まれており、これらのセグメントは必要に応じて相互に重なり合うように折り畳まれて所定の反応を達成することができるようになっている。第1セグメント上のサイトには最初から指定の試薬が含まれていることが望ましい。すなわち前記試薬が装置中に存在するか含まれていると、問題の分析を開始する前に該試薬を準備する必要がなくなる。このことは第2セグメント上の検出用試薬にも適用することができ、この試薬についても最初から装置中に存在させておくことができる。

過剰試薬すなわち例えば試料と試薬との接触中に反応しなかつた試薬を分離するための手段（arrangement）が少なくとも1つ装置に含まれており、前記手段は検出可能物質の存在が指示

またはそれ以上の成分または反応体をその他の成分または反応体から分離する段階を含むものが多い。例えば固相相（固相試薬または反応により形成された固相相）から液相相を分離することなどがこれに当てはまる。本発明装置では、この分離操作も非常に小型で操作の簡単な装置の中に組み込まれているため、このような種類の分析に対して特に有利であることが判つている。外部から追加する必要のある試薬あるいは付着品があるとすれば洗浄液くらいである。洗浄液は特に化学的に安定している上普通の水から成っている場合も多いため、実用上別個に取り扱い方が望ましい。また、洗浄液の使用については試料の場合と違つて余り正確さを要しないということもある。

分離用手段は例えば分離用素子（separation element）または媒体を備えた第3のセグメントとなり得、このセグメントはそれぞれ第1セグメントと第2セグメントの間に折り込んで所望の分離を達成するように配置または装荷される。このような分離用手段についても、使用された他の試薬の場合と同様、先行技術に完全に従つて選択されていることに注目すべきである。多くの場合、濾紙を用いるだけで所望の機能を得ることができ、これは勿論コストダウンにもつながる。

本発明の別の好適実施態様によれば、試薬の分離手段は第1

特表昭61-500565(6)

セグメント上のサイトに隣接して配位した1つまたはそれ以上の分離または吸収媒体である。言い換えると、この場合セグメントを余分に使用することなく、前記手段は試料と試薬の接触が行われるセグメントに含まれるのである。前記媒体が第1セグメントの前記サイトに隣接して配位されるということは、原則的に、液体すなわち一般的には洗浄液を試料の使用量以上の量で適用するだけで作動できるということを意味するものである。言い換えると、吸収媒体によつて液体が自動的に吸い上げられるのである。このことは、第1セグメントに少なくとも1つのウエルまたは容器内に吸収材を配位して、該ウエルまたは容器に第1セグメント上のサイトから液体が流れ込む開口を設けることによつて達成される。

場合により、分析には検出を遂行する前に何段階かの反応が含まれることがある。本発明装置はその単純さにもかかわらず、このような場合にも有用なものである。すなわち、その中に所望の試薬を含む別のセグメントを設け、試料または先の段階で形成された反応生成物と反応できるように何れか適当な順序で折り畳めるように装置するだけで良い。

本発明による別の実施態様は、補助的セグメントを含む嵌脱であり、これにより試料が別のセグメント上の試験と接触すべ

で詳述する必要はないと考える。但しその例として、螢光とル  
ミネセンスを区別することができる。

場合によつては、例えば所定時間が過ぎた後などに、分析に用いる検出反応を止めて、形成された色と基準色とを正確に比較したい場合もある。このような場合、使用する検出反応に対する抑制剤を含むサイトを取付けた余分のセグメントを装置に設けることができる。このセグメントは、検出反応の行われるセグメントと接触するように折り曲げて検出反応を抑制または停止させることができるように配設される。

本発明による装置の有利な利用法は、分析に通常は液相である流体相を固体相から分離すること及び流体相中の物質の検出を行うことが含まれる場合に見られる。このような場合の好適な装置は、第1セグメント上のサイトが容器から成り、その中に試料を入れて容器中に存在する固体相の試験と反応させるか、あるいはまた固体相が形成されるように反応させるようになっており、第2セグメント上のサイトが所望の流体相の物質用の検出用試薬を含んでいることと、流体相は通過させるが固体相は通過させないようにできる分離手段を含む第3セグメントが第1セグメント上の容器と第2セグメント上の検出サイトとの間に折り込めるように配設されていることを特徴とする。

く折り曲げられる前に、該仮破砕料を適用するため或いは該試料を希釈するだけのために設けられる。

本発明による装置のさらに別の実施態様は、検出用試薬が発色試薬であり、セグメントの1つが1つまたはそれ以上の基準色をつけた1つまたはそれ以上の窓を含んでおり、形成された色をこの基準色と直接比較して分析評価できるようにした装置である。換言すると、この装置には予め1つまたはそれ以上の色が与えられており、これによつて検出物質の定性的または定量的測定が直接与えられると共に、分析で形成された色をこれと比較できるようになっている。望ましくは、前記1つまたはそれ以上の窓を分析で形成された色が顕色化すると同一のセグメント内に設けて比較すべき色または濃淡が互いに隣接し合うようにする。

最後に述べた実施態様は視覚的な読取りを直接可能にするものであるが、このような視覚的読取りを高精度に行える場合であつても、光学的に色を検出したいこともある。本発明の装置はもちろんこの様な目的のために構成し得、発色した色を光学的に読取るための装置の中または上に直接挿入できるようにすることも可能である。発色する試薬以外の検出用試薬も使用することができるが、この場合は先行技術に準じる。従つてこゝ

液とする。従つてこの場合、装置を逆転すると、液体相とそれによつて被検出物質とが、検出反応による固相からの阻害を受けることなく検出用試薬と接触することになる。

試料を適用するまで外的影響から保護した状態で第1セグメントの容器中に試薬を貯蔵するために、容器の開口部は例えば箔など何らかの形の保護層で被覆しておき、これによつて試料の適用まで試薬を定位域に保つことが望ましい。

本発明装置のこの他に有利な用途は抗原抗体反応に基く酵素免疫測定法における使用であり、この場合の装置の特徴は、第1セグメントが試料を適用するための透明プラスチック製のサイトと、望ましくは対照試料用の第2のサイトとを有しており、該プラスチックは抗体または抗原の形態にある試薬を固定して形成されていることにある。このようにプラスチック面に抗原または抗体を固定することは周知であり、「免疫酵素技術」(S.アブラメアス、P.ドリユウ、R.マツサイエフ、G.フェルドマン編)エルセビエ・サイエンス・パブリッシャーズ発行、アムステルダム／ニューヨーク／オックスフォード、1983などの文献に記載されている。装置はさらに、第2セグメントが抗原-酵素-酵素基質の形態で検出用試料をもつサイトを有しており、第3セグメントが可塑性で選択的に短縮乾燥された酵素基

# 特表昭61-500565(6)

臓抗体または抗原をもつ吸収パッド付きのサイトを備えており、前記第3セグメントは、第2セグメントが前記第1セグメントに重なり合うように折られる前に第1セグメントに重なり合うように折られるべく構成されていることを特徴とする。さらに、装置は第1セグメント上の少なくとも1つのウェルの中に配置された吸収材の形態で分離手段を含んでおり、洗浄液を第1セグメントの透明プラスチックにかけて、第2セグメントを折り畳んで第1セグメントに重なり合わせる前に反応しなかつた試薬を洗い流す場合、前記洗浄液が自動的に前記吸収材に吸収されるようになっている。

先にも述べたように、本発明による装置には多くの機能を組み入れることができる。従つて、以上に述べた化学的作用部品とは別の種類のセグメントを1つまたはそれ以上設けることもできる。本発明によるこのように有利な装置の例としては、装置の操作方法に関する指示および／または患者のデータなどを付けた1つまたはそれ以上のセグメントを含み、このセグメントもまた所望の順序で相互に重なり合うように折り畳み可能となつている装置、あるいはセグメントがパッケージを密封するべく折畳むことのできる閉鎖機構を提供していることを特徴とする装置などがある。

法、蛍光免疫測定法、ルミネッセンス免疫測定法および核磁気共鳴のハイブリダイゼーション反応を用いる分析などにおけるものである。

## 図面

次に本発明による装置について、本発明の好適実施形態の2例を示す添付図面に関連してより詳細に説明することにする。

第1a図は6つのセグメントを含み、分離手段が特別セグメントとなつている装置の平面図である。

第1b図は第1a図からの4つのセグメントを示す側面図である。

第2図は折り畳んだ状態の第1a図の装置をそれぞれ上と下から見た図である。

第3～4図は第1a図の装置を酵素免疫分析に用いた場合の分析手順を示す。

第5a図は3つのセグメントを含み、分離手段が第1セグメント上にある第2の装置の平面図である。

第5b図は第5a図の装置の底面図である。

第5c図は第5a図の装置を断面線X-Xに沿つて取つた断面図である。

第6a図は折り畳んだ状態の第5a図の装置を拡大比2:1で

自己指示型折畳み方式をさらに完成、改良して誤操作による危険性をできるだけ無くすために、本発明による別の有利な装置は、番号つきまたは色分けしたタブがセグメントの開放順序を段階的に指示することを特徴とする。装置はまた、ある種のセグメントが使用後装置から除去するべく引きちぎれるように構成されていることを特徴とするべく設計することもできる。例えば、分析結果を読み取るセグメント、また例えば患者の同定、試験の種類、時間、連番など、関連データが存在するものあるいは記されたものだけを残すのに適当である。

セグメントの折り曲げ及びいろいろなセグメントの重なり合いに関しては、本発明の装置ではセグメントが本質的に相互に重なり合うように折れるよう設計するのが望ましい。つまり、セグメントは全て最初すなわち装置の使用態勢ができた時点から、適当な順序で互いの上に1つの積重ねとなるように折られているのである。こうすると、最終的なパッケージは非常に小型化された形状、つまり折り畳み可能なカバーをかけたマツチ箱状となる。

さらに、本発明は一般的な化学分析、特に医学及び生物学分野における化学分析に用いる上述の装置の使用法にも関係する。この関係で好適な使用法は免疫化学分析、例えば酵素免疫測定

示している。

第6b図は、折り畳んだ状態の第5a図の装置を断面線X-Xに沿つて取つた断面図で2倍に拡大したものである。

第6c図は、折り畳んだ状態の第5a図の装置を断面線X-Xに沿つて取つた断面図で2倍に拡大したものである。

第7図は、第5a図の装置を酵素免疫分析に用いた場合の分析手順を示す。

第1図に示した装置は6つのセグメント6～11を有する連続シートから成り、そのうちセグメント6～9は化学的に作用するサイトを示し、セグメント10と11は化学的操作の補助的セグメントとなつている。さらに、セグメントのいくつかは装置の開け方順序を示すべく1から5の番号を付けたタブを備えている。さらに図面では、装置をシールするための小型の折り畳み式セグメント12が示されている。

より詳細に言うと、セグメント6は固体相試薬14を内蔵し、箱15によつて被覆されている反応容器13を含む。セグメント7には濾紙である領域16が備えられており、セグメント8は酵素基質の形態の化学的活性表面17と保護用の透明プラスチック箱18とを含む。セグメント9の方は、酵素抑制剤の形で化学的活性表面19を有している。

特表昭61-500565(7)

上述したように、第2図は折り畳んだ状態の装置をそれぞれ上と下から見たところを示しており、参照符号は第1図と同じである。ただし、第2図は2つの色試験窓20を示しており、分析で形成された表面17の色をこれと比較することができる。

ここに示した装置の操作については第3～4図を参照する。同図には1から8までの番号を付けた順序が示されており、その順序については次のように説明することができる。

I. キットまたはパッケージをタブ1により開く。ペン21で示されている個所に患者の名前その他データなども記入することができる。

II. タブ2を開く。試験棒22を使って箱15に穴をあけて、反応容器13の中に試験棒で試料を入れる。試料を試験棒を用いて混ぜ、反応混合物14とする。次に適当な時間、試料をインキュベートする。必要に応じて次に、フラップ7で再び封をする。

III. インキュベーション後、タブ2が封されている場合は再びそれを開ける。

IV. タブ3を開き、それによつて濾紙の表面16が露出する。前記表面の下には酵素基質面17がある。濾紙16付きのセグメントを折つて、反応容器13の上にかぶせる。

を有しており、これらは全て分析過程で積極的役割を果たすものである。さらに、セグメント31と32には装置を開く順序を示す色分けしたタブ33と34が設けられている。

セグメント30は透明のプラスチック表面35を含み、これに抗体(または抗原)が化学的または物理的に固定されている。プラスチック表面35上には試料用に印をつけたスポット36と対照標準または標準用に印をつけたスポット37とがある。プラスチック表面35の周囲には、底板51上のウエルの中にある吸収膜48の形態で内蔵式分離手段が存在する。

セグメント31はウエル50を含み、その反対側の凸側38には酵素基質を含む吸収パッド39が取付けられている。これと対応するように、セグメント32の上側の凸側40にも盛り上がりがあり、これには酵素標識した抗体(または抗原)を含む吸収パッド41が取付けられている。パッド39と41に関しては、セグメント31または32をそれぞれ適当に折り曲げることにより、これらのパッドがそれぞれプラスチック表面35と重なり合うように構成されている。作動していないパッドは、他方のパッドの反対側に形成された凹所(それぞれ49または50)の中に納まる。

セグメントの折り曲げは、折り線42により簡単になつてい

V. 装置を一時的に逆転する。

VI. タブ4を開くことにより、酵素基質の表面17と酵素抑制剤の表面19が露出する。

VII. タブ5を用いて表面18を表面17にかぶさるように折ることにより、任意的酵素反応を停止させる。折り曲げた後、これらの表面は図示のものでは開閉自在の粘着剤を備えているために互いに接着した状態となつている。

VIII. 次にその他のセグメントは引きちぎつたりはぎ取つたりすることができる。互いに接着した状態で残つた2つのセグメントの上には、患者の名前とデータが見られる。

IX. 残つたセグメントの反対側にある窓を通じて、得られた発色反応を窓20の基準色と比較して読取る。

例示した反応に関する限り、発色反応は反応容器13中の固体相14に吸収されなかつた酵素の量に依存している。従つて反応容器13の反応システムは、固体相14により吸収された酵素の量が試料中に存在する抗原または抗体にそれぞれ直接依存するような組成となつている。第3図の段階Vの逆転で、固体相14が酵素基質表面17に達しないようになつている濾紙16に試料は吸収される。

第5図と第6図に示された装置は3つのセグメント30～32

る。第6図に示される折畳まれた開始位置においては、セグメント31がセグメント32の底側に對して折られており、スナップ式固定具43により固定されている。セグメント32の方はセグメント30に対して折り畳まれており、セグメント30のウエル45内に可逆的に固定された2つの固定ピン44により固定されている。セグメント32の端み46はセグメント31を開く際にタブ34を把めるようにしているが、端み47もセグメント32をセグメント30に対して折り曲げて固定ピン44で固定する可能性を残したままセグメント31をセグメント32の上側に折り曲げられるようにしている。

第5～6図に示した装置の操作について、第7図を参照すると、XXからXXVまでの番号で手順が示されており、その手順については次のように説明できる。

XX. タブ33によりパッケージを開く。所望により、患者の氏名とデータをパッケージの裏側に記入することができる。

XXI. 試料を表面35のスポット36に適用する。試料が液体の場合、例えば表面の上に試料を滴下するなどして達成できる。これに相当する方法で比較標準または標準をスポット37に適用する。被試験物質が試料、比較標準または標準中に存在する場合、それはプラスチック表面35に固定された抗体(またはは

## 特表昭61-500565(8)

抗原)と反応してこれと結合する。

XXI. パッケージを再び封止する。それによつて第2の分析段階が開始される。被試験物質の存在する場合、それは吸収パッド41の中にある溶解性酵素標識抗体(または抗原)と反応してこれに結合される。それにより酵素標識抗体も、XXI段階から続いている反応によつてプラスチック表面35に間接的に結合されることになる。

XXII. 適当な反応時間の経過後、パッケージをタブ33により再び開ける。次に洗浄液が表面35上に溶とされることによつて、被試験物質と反応しなかつた可溶性酵素標識抗体を洗い流す。

XXIII. タブ34を用いてセグメント31を開き、これをセグメント32の上面に折り込む。

XXIV. パッケージを再び封止する。それによつて検出反応が開始する。最初の反応段階で反応した酵素標識抗体は、吸収パッド39の発色性酵素基質を色付き物質に変換する。

XXV. 適宜な反応時間をおいた後、透明プラスチックの窓35を通してパッケージの裏側で結果が読み取られる。試験スポット36上に形成された色をスポット37上の比較標準反応の結果または基準色と比較する。

した。吸収パッド39と41については、ワットマン®3MM濾紙(ワットマン・リミテッド、英國、ケント、メイドストン(Whatman Ltd., Maidstone, Kent, U.K.))を用いた。これらの濾紙パッドに従述するように各タイプの応用のための試料を浸漬した。

チログロブリンのアッセイのため、装置には表面35を被覆して試料の蒸発を防ぐことのみを目的とする別のセグメントを取付けた。

### ヒト絨毛性ゴナドトロピンのアッセイ

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は分子量46000程度の小さな蛋白質である。このアッセイは妊娠診断に役立つ。

### 装置の準備

hCGのアルファサブユニットに対するモノクローナルな抗体(クローン5503、オイ・メディツクスAB、フィンランド、カウニアネン(Oy Medix Ab, Kaunainen, Finland))を10μg/mlに希釈したものを75μL、それぞれのスポット36、37に塗布することにより、プラスチックスライド35にその抗体を固定した。希釈剤(略してPBS)は0.05mol/Lの炭酸ナトリウム、0.15mol/LのNaCl、pH7.2であつた。スライドを湿度室(humidity Chamber)の中に4℃で18時間イン

例示した分析順序に関しては、発色反応はXXIIの洗浄段階の後表面35に存在する酵素の量に直接依存するということがさらに付言できる。この量は酵素標識抗体(あるいは抗原)に結合することができ且つ同時に表面35に固定された抗体(抗原)に結合する試料中の被試験物質の存在に直接依存する。

### 実施例

次に挙げる実施例は、本発明による装置をより詳細に説明することを意図したものである。これらの例は、小分子量および非常に高分子量の蛋白質とウィルスの測定に装置を応用した場合について説明している。

全ての応用例に関し、第5〜6図の装置を1:1の尺度で用いた。セグメント30〜32はポリ塩化ビニル(PVC)から製造した。透明プラスチック表面35は免疫グレードのポリスチレン(ヌンクA/S、デンマーク、ロスキルド(Nunc A/S, Roskilde, Denmark))製の長方形スライドで構成し、表面上に円形スポット36と38を配した。各々のタイプの応用に於いて後述するように抗体をこれらのスポットに固定した。

分離手段の吸収材料38をセルローススポンジ(ウエンテックス®、セロプラストAB、スウェーデン、ノルコピング(Wentex®, Celloplast AB, Norrköping, Sweden))から作成

キュベートした。次にPBS中に0.05%のトウイン®(Tween)-20(メルク、ドイツ、ホーヘンブルン(Merk, Hohenbrunn, Germany))で成る洗浄液(略してPBS-トウイン)約10mlを用いてこれらを洗浄した。その後、PBS中に1%W/Vの牛血清アルブミン(シグマ・ケミカル・カンパニー、ミシシッピ州セントルイス(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.))を含む溶液(略してPBS-BSA)を含む皿の中にスライドを没して、室温で90分間インキュベートした。その後スライドをもう一度10mlのPBS-トウインを用いて洗浄した後10mlの蒸留水で洗浄し乾燥させた。

吸収パッド41にはhCGのベータサブユニットに対するペルオキシダーゼ共役モノクローナル抗体(センシ・クロム™共役試薬(Sensi-Chrome™ Conjugate Reagent) Hoffman-La Roche、インコーポレイテッド、米ニュージャージー州ナトリ(Hoffman-La Roche Inc., Nutley, New Jersey, U.S.A.))の非希釈溶液を浸漬させた。吸収パッド39には、E.S.ボス他(1981年)の免疫アッセイジャーナル2, 187に記載の通り調製した0.42mmol/Lの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(マイルズ・ラボラトリーズ・インコーポレイテッド、米インディアナ州、エルクハート(Miles Labora-



tories, Inc., Elkhart, Indiana, U. S. A.)), pH 6.0, 0.1 mol/l の酢酸ナトリウム/クエン酸緩衝液中の 1.4 mmol/l の過酸化尿素の発色基質溶液を浸漬させた。

#### アッセイの実施

アッセイは本質的に第 7 図に示されたように、XX-XXV の手順で行った。ただし、次のように試料、量、時間、その他の条件などについての詳細を付け加えることができる。

アッセイ用の試料として、それぞれリットルあたり 3900 と 550 国際単位の所定 hCG 濃度のリフォチエック® Lyphochek® I と II のヒト対照尿 (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ・インコーポレイテッド、米国カリフォルニア州アナハイム (Bio-Rad Laboratories, Inc., Anaheim, California, U. S. A.)) を用いた。これらの試料をさらに周知の陰性尿試料を用いて、1:2、1:4、1:8、1:16 に希釈した。周知の陰性尿試料をブランクとして用いた。

装置を開けて、各試料を約 50  $\mu$ l の 1 滴ずつスポット 36 に塗布し、同じ量のブランクをスポット 37 に塗布した。次にセグメント 32 をセグメント 30 上に折つて装置を閉じ、吸収パッド 41 中の共役抗体をプラスチック表面 35 に移した。装置を閉じたまま 15 分間室温でインキュベートした。

ここから分かるように、2つの方法の間には良好な相関関係が認められた。

#### ヒトチログロブリンのアッセイ

ヒトチログロブリンは分子量約 660,000 と比較的大きな蛋白質である。この検定は甲状腺癌の検査に有用なものである。

#### 装置の準備

抗ヒトチログロブリンモノクローナル抗体 (クローン TF-33、ノボ・インドустリ A/S、デンマーク、バグスベルド (Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark)) を 10  $\mu$ g/ml 希釈したものを 75  $\mu$ l、スポット 36 と 37 のそれぞれに塗布して、プラスチックスライド 35 に抗体を固定した。希釈剤 (略して PBS) は 0.05 mol/l の酢酸ナトリウム、0.15 mol/l の NaCl、pH 7.2 であった。スライドを 4  $^{\circ}$ C の湿度室中で 18 時間インキュベートした。次に PBS 中に 0.05 % のトウイン®-20 (メルク、ドイツ、ホーヘンブルン) を含む約 25 ml の洗浄液 (略して PBS-トウイン) を用いてスライドを洗浄した。その後、PBS-トウイン中に 1 % W/V の牛血清アルブミン (シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズリー州セントルイス) で成る溶液 (略して PBS-BSA) を含む皿の中にスライドを浸して、室温で 45 分間インキュベートした。

#### 特表昭 61-500565 (9)

次に装置を再び開けて表面 35 を露出し、これを約 1 ml の PBS-トウインで洗浄した。セグメント 30 上に折つて、吸収パッド 39 中の発色基質をプラスチック表面 35 上に移した。装置を再び閉じて、室温で 5 分間インキュベートした。その後直ちに透明プラスチックのスポット 36 と 37 を通して色の反応を装置裏側で読み取った。薄い青を "+", はつきりした青を "++", 強い青を "+++" で表示した。アッセイの結果を市販の妊娠テストであるセンシ・クロム™ (ホフマン・ラロシュ・インコーポレイテッド、米国ニュージャージー州ナトリー) を試験管内で同時に行つて、これと比較した。

#### 結 果

試 料	本発明装置	センシ・クロム™方法
周知の陰性尿試料	-	-
リフォチエック® II 1:16	+	-
リフォチエック® II 1:8	+	+
リフォチエック® II 1:4	++	++
リフォチエック® II 1:2	+++	+++
リフォチエック® II	+++	+++
リフォチエック® I	+++	+++

吸いてスライドを再び約 25 ml の PBS-トウインで洗浄した後、さらに 25 ml の蒸留水で洗浄して、最後に圧縮空気流の下で乾燥させた。

吸収パッド 41 には、ペルオキシダーゼ共役のラビット抗ヒトチログロブリン (ダコパツ A/S、デンマーク、グロストラブ (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark)) を PBS-BSA 中に 1:500 に希釈した溶液を浸漬させた。吸収パッド 39 には 0.05 % W/V のオルト・フェニリン・ジアミン (シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズリー州セントルイス)、0.01 % V/V の  $H_2O_2$  を 0.06 mol/l の酢酸ナトリウム、0.03 mol/l のクエン酸ナトリウムに溶解した pH 5.0 の発色基質溶液を浸漬させた。

#### アッセイの実施

アッセイは本質的に第 7 図に示されたように、XX-XXV の手順で行った。ただし、試料、量、時間、その他の条件の詳細については次のように付言できる。

このアッセイの試料としては、PBS-BSA 中にもそれぞれ 500 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml の精製ヒトチログロブリン標準 (ノボ・インドустリ A/S、デンマーク、バグスベルド) の溶液を用いた。チログロブリンを加えない PBS-BSA をブランクとして用いた。

特表昭61-500565(10)

以上から分かるように、本発明装置は分析物の濃度が非常に低い場合に半定量的な情報を提供することができた。

ネコ白血病ウイルスのアッセイ

ネコ白血病ウイルスのアッセイは、獣医学的に猫の白血病を診断する上で重要である。

装置の準備

50  $\mu$ L の抗猫白血病ウイルスモノクローナル抗体（クローン1、ケンブリッジ・バイオサイエンス・コーポレーション、米国マサチューセッツ州ホプキントン（Cambridge BioScience Corporation, Hopkinton, Massachusetts, U. S. A.））を10  $\mu$ g/mL 希釈の濃度で、スポット36と37にそれぞれ塗布することによつて、抗体をプラスチックスライド35に固定した。希釈剤（略してPBS）は0.05 mol/L 磷酸ナトリウム、0.15 mol/L NaCl、pH 7.2であつた。スライドを37℃の湿度室中で3時間インキュベートした。次にPBS中に0.05%のトウイン®-20（シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズリー州セントルイス）で成る洗浄溶液（略してPBS-トウイン）を約10 mL用いて、これらのスライドを洗浄した。その後、PBS中に1% w/v の牛血清アルブミン

装置を開けてスポット36に各試料を25  $\mu$ Lずつ塗布し、同量のブランクをスポット37に塗布した。蒸発を防ぐために余分に設けられている蓋を閉じて、装置を室温で30分間インキュベートした。次に表面35を約1 mLのPBS-トウインを用いて洗浄した。

洗浄後、セグメント32をセグメント30上に折つて装置を閉じ、吸収パッド41の共役抗体をプラスチック表面35に移した。装置を閉じたまま、室温で30分間インキュベートした。

次に装置を再び開けて表面35を露出し、これを約1 mLのPBS-トウインで洗浄した。セグメント31をセグメント30上に折つて、吸収パッド39の発色基質をプラスチック表面35上に移した。装置を再び閉じたまま、室温で10分間インキュベートした。その後直ちに透明プラスチックのスポット36と37を通じて色の反応を装置裏側で読み取つた。薄い黄色を“+”、はつきりした黄色を“++”、強い黄色を“+++”で表示した。

結 果

ヒトチログロブリン標準（PBS-BSA中）

濃 度	反 応
500 ng/mL      750 pmol/L	+++
100 ng/mL      150 pmol/L	++
10 ng/mL       15 pmol/L	+
ブ ラ ン ク	-

（シグマ・ケミカル・カンパニー、米国ミズリー州セントルイス）で成る溶液（略してPBS-BSA）を含む血の中にスライドを浸して、37℃で60分間インキュベートした。続いてスライドを再び約10 mLのPBS-トウインで洗浄した後、10 mLの蒸留水でさらに洗浄し、乾燥させた。

吸収パッド41にはペルオキシダーゼ共役の抗ネコ白血病ウイルスモノクローナル抗体（クローン2、ケンブリッジ・バイオサイエンス・コーポレーション、米国マサチューセッツ州ホプキントン）を1:5に希釈した溶液を浸漬させた。吸収パッド39は、0.05 mmol/L 磷酸ナトリウム緩衝剤中に0.1% w/v 2, 2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリン・スルホネート（ベーリンガー・マンハイム GmbH、ドイツ、マンハイム（Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany））、0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の発色基質溶液、pH 6.0を浸漬させた。

アッセイの実施

アッセイは本質的に第7図に示した通り、XX~XXVIの手順で遂行した。ただし、試料、量、時間、その他の条件の詳細については、次のように付言できる。

このアッセイでは、疑いのある猫から採取した実際の血清試料を10種用いた。PBS-BSAをブランクとして使用した。

装置を開けて、各試料を1滴約50  $\mu$ Lずつスポット36に塗布し、同量のブランクをスポット37に塗布した。次にセグメント32をセグメント30上に折り曲げて装置を閉じて、吸収パッド41の共役抗体をプラスチック表面35上に移した。装置を閉じたまま、室温で15分間インキュベートした。

次に装置を再び開けて表面35を露出し、これを約5 mLのPBS-トウインで洗浄した。セグメント31をセグメント30に折り曲げて、吸収パッド39内の発色基質をプラスチック表面35上に移した。装置を再び閉じたまま、室温で2分間インキュベートした。その後直ちに透明プラスチックのスポット36と37を通して色の反応を装置裏側で読み取つた。薄い緑色を“+”、はつきりした緑色を“++”、濃い緑色を“+++”で表示した。アッセイの結果を、市販のネコ白血病ウイルス用テスト（ピットマン・ムーア・インコーポレイテッド、米国ペンシルバニア州フィラデルフィア（Pitman-Moore, Inc., Philadelphia, Pennsylvania, U. S. A.））をマイクロタイトレーション カップ内で同時に行つた結果と比較した。

結 果

試料番号	本発明装置	ピットマン・ムーア法
1	—	マイナス
2	—	マイナス
3	—	マイナス
4	+	マイナス
5	—	マイナス
6	—	プラス
7	+	プラス
8	+++	プラス
9	+++	プラス
10	+++	プラス

両方法は10試料中8つの結果について一致した。結果の異なる試料4と6については、操作上の要因か、試料の臨床状態に原因したものと考えられる。

特表昭61-500565 (11)

浄血(内容に変更なし)

Fig. 1a

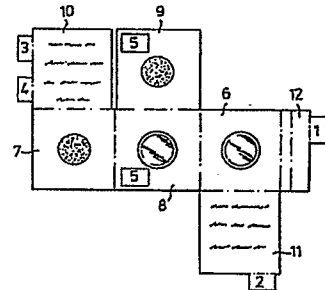


Fig. 1b

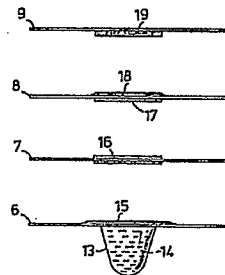


Fig. 2

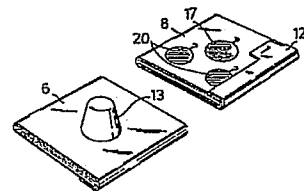


Fig. 3

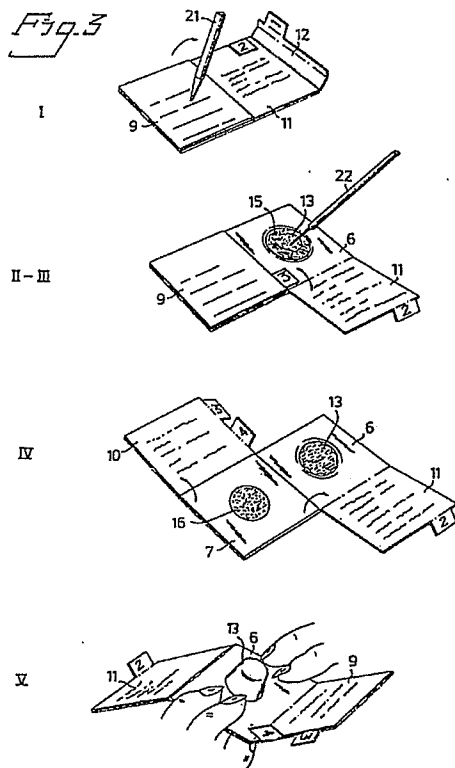
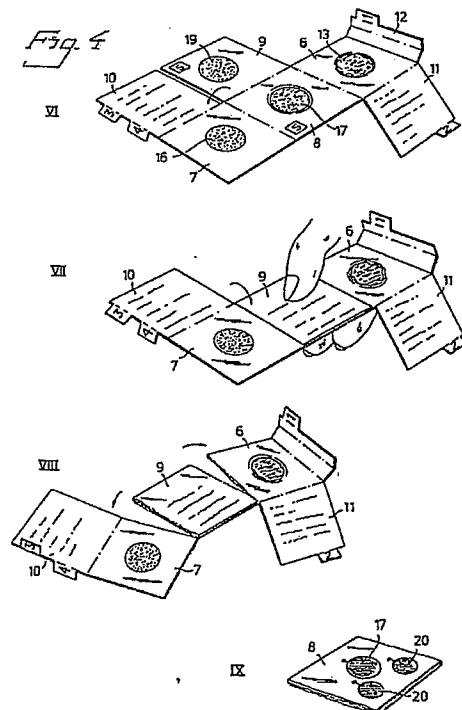
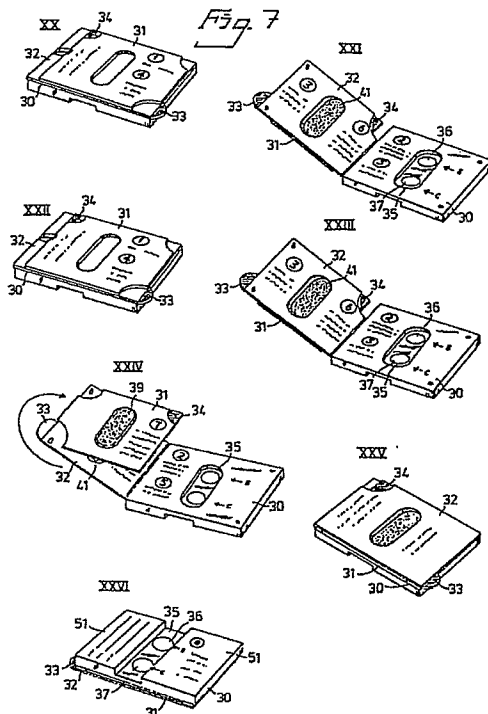
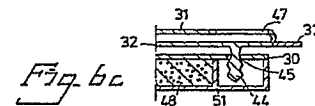
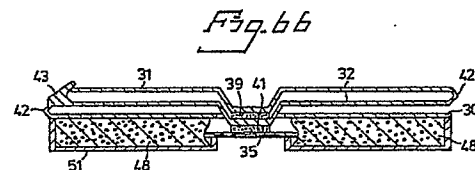
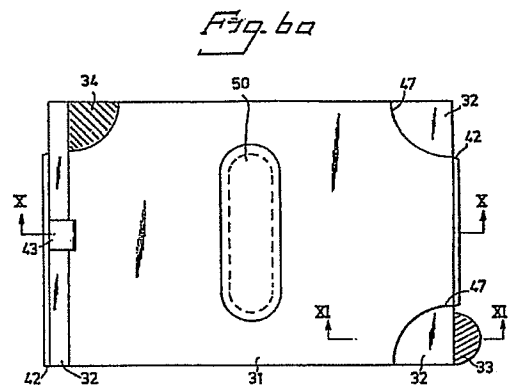
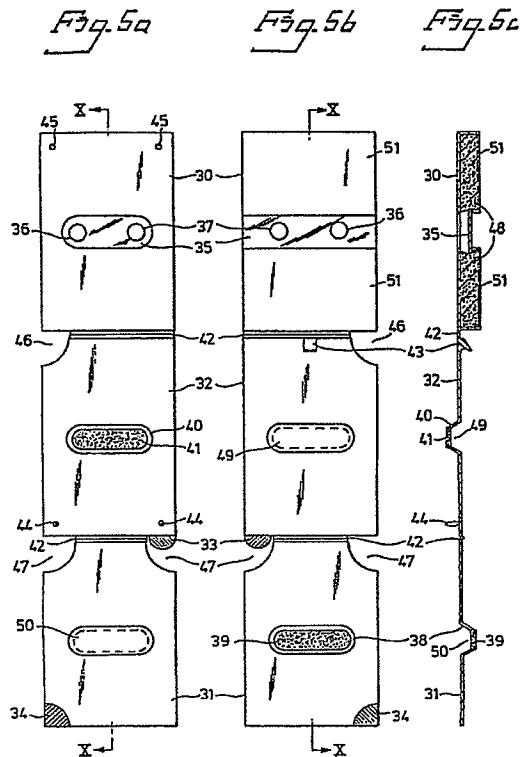


Fig. 4





手続補正書

昭和60年10月3日

特許庁長官 宇賀 道 郎 殿

1. 事件の表示 PCT/SE 84/00409

2. 発明の名称 化学分析装置とその使用

3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人

名 称 ヴェルトリク・バイオテクニク・アー・ベー

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル  
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8623  
(6200) 弁理士 川口 毅 雄

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 図面の翻訳文

8. 補正の内容  
(1) 鮮明な図面の翻訳文を別紙の通り補充する。  
(内容に変更なし)



## 國際調查報告

[illegible]

